SYNTHÈSE DE SUBSTANCES PARA-HUMIQUES PAR *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*.

II. — ÉTUDE CHIMIQUE COMPARATIVE AVEC DES EXTRAITS HUMIQUES DE SOLS (*)

par C. HARDISSON (**) et Mme M. ROBERT-GERO

(*Service de Microbiologie du Sol, Institut Pasteur, Paris*)

INTRODUCTION

Le mécanisme de formation des substances humiques dans le sol est un problème à la fois très important et très complexe. L'hypothèse de Flaig [**9**], expliquant la formation des substances humiques par dégradation de la lignine (oxydation et déméthylation) jusqu'au stade phénols, oxydés ultérieurement en quinones qui se condensent ensuite avec des acides aminés pour former des acides humiques, est une des voies possibles de formation de substances humiques dans le sol ; mais elle n'est pas la seule. Ainsi, Kononova [**16**] soutient que les substances humiques peuvent se former à partir d'autres substrats aromatiques d'origine végétale (tannins, flavonoïdes, etc.). De plus, on a trouvé dans les sols [**29**, **32**] des monomères aromatiques libres (entre autres du benzoate), qui peuvent servir à la synthèse des substances humiques par voie bactérienne.

L'étude des substances para-humiques synthétisées par des souches pures de microorganismes cultivés sur un milieu de composition bien définie a été récemment proposée [**8**] comme un des meilleurs moyens pour la connaissance du phénomène de l'humification.

Nous avons entrepris une étude comparative d'une substance para-humique, synthétisée par une souche d'*Azotobacter chroococcum* cultivé sur benzoate de sodium comme seule source énergétique, et des extraits humiques de trois types de sols : mor forestier (horizon A_0), mull forestier (horizon A_1), rendzine, afin d'établir une analogie éventuelle entre eux.

(*) *Société Française de Microbiologie,* séance du 6 juin 1966.
(**) Boursier du Ministère d'Education Nationale d'Espagne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

EXTRACTION. — Pour les trois sols, nous avons utilisé la méthode d'extraction au pyrophosphate de sodium décrite précédemment [23]. Les extraits bruts lyophilisés dans un lyophiliseur Lyoboy C. S. D. (Secfroid) ont été repris dans de l'eau distillée, puis dialysés afin d'éliminer les sels et les petites molécules. L'eau de dialyse est changée fréquemment jusqu'à ce que son pH soit égal à celui de l'eau distillée et qu'elle soit incolore.

Les eaux de dialyse sont concentrées sous vide, puis lyophilisées (fraction D).

La fraction non dialysable est également lyophilisée et gardée dans un dessiccateur sous vide (fraction ND).

L'obtention de la substance para-humique synthétisée par *Azotobacter chroococcum* a été décrite précédemment [10] ; cette substance est également divisée en fraction dialysable et non dialysable.

FRACTIONNEMENT. — Les parties dialysables ont été fractionnées par passages successifs sur résines échangeuses d'ions : cationique (Dovex 50 H^+) et anionique (Amberlite IR45OH^-). Comme éluants, nous avons utilisé NH_4OH 2 N pour obtenir la fraction basique et ClH à concentrations croissantes jusqu'à 2 N pour l'obtention de la fraction acide. Dans ces différentes fractions, nous avons dosé les acides aminés, les glucides et les acides organiques.

DÉTERMINATION DES POIDS MOLÉCULAIRES APPROXIMATIFS PAR PASSAGE SUR GEL DE SEPHADEX G-75, G-100 et G-200 — Comme éluant, nous avons utilisé une solution 0,01 M de ClNa. Les fractions ont été recueillies, par volumes de 5 ml, à l'aide d'un collecteur de fractions Seive. La densité optique des fractions à été mesurée à 450 mμ à l'aide d'un photocolorimètre Spectronic 20 [20].

ETUDE SPECTROMÉTRIQUE. — L'examen dans l'U. V. a été fait en utilisant un spectrophotomètre Beckman DK-2A.

Les fractions non dialysables ont été mises en suspension dans le nujol et passées dans un appareil Perkin-Elmer infracord, avec prisme de ClNa, pour enregistrer le spectre I. R.

a) *Etude chimique.* La méthode de Burges [3] a été utilisée pour le fractionnement classique en acides humique, fulvique et hymétomélanique des fractions non dialysables.

b) La *matière organique* a été déterminée par perte au feu à 450° C dans un four électrique.

c) Le *carbone organique* a été dosé par la méthode d'Anne modifiée [5] et l'azote par la méthode dite microkjeldahl.

d) *P total* a été déterminé par la méthode de Fiske et Subbarow modifiée par Faure [7].

e) *NH_2 total* a été déterminé par la méthode de Rosen [25] avant et après hydrolyse par ClH-6 N dans des tubes scellés, à 105° C pendant seize heures.

f) Les *acides aminés* ont été mis en évidence par chromatographie couche mince sur plaque de cellulose M N 300 (Macherey et Nagel) ; les solvants utilisés ont été les suivants :

n-propanol : eau	7 : 3	[33]
n-propanol : ammoniaque 8,8 p. 100	8 : 2	[33]
n-butanol : acide formique : eau..................	6 : 1 : 2	[1]
n-butanol : acide acétique : eau...(phase organique)	4 : 1 : 5	[33]

Les acides aminés ont été révélés par une solution 0,2 p. 100 de nynhidrine dans l'éthanol.

Les *hexoses* ont été déterminées par la méthode à l'anthrone [28].

g) Les *glucides* ont été mis en évidence par chromatographie couche mince sur plaque de cellulose et sur papier Whatman n° 1, avant et après hydrolyse acide dans HCl 2N dans tubes scellés à 105° C pendant quatre heures. Les solvants utilisés ont été les suivants :

acétate d'éthyle : pyridine : eau....	2 : 1 : 2	[13]
n-butanol : acide acétique : eau....	2 : 1 : 1	[12]
n-butanol : éthanol : eau	4 : 1,1 : 1,9	[12]

Révélateurs utilisés : phtalate d'aniline [22] et solution acétonique de NO_3Ag.

h) Les *acides organiques* ont été mis en évidence par chromatographie couche mince sur cellulose, sur gel de silice G (Merk), et sur papier Whatman n° 1. Les solvants utilisés ont été les suivants :

n-butanol : acide formique : eau.......	6 : 1 : 2	[1]
propanol : ammoniaque	6 : 4	[1]
éthanol 96° : NH_3 25 p. 100 : eau	25 : 4 : 3	[2]

Comme révélateur, nous avons utilisé le réactif de Linskens [19] et le vert de bromocrésol.

RÉSULTATS

Propriétés physico-chimiques.

Les trois extraits humiques et la substance para-humique microbienne ont les propriétés typiques des substances humiques : couleur noire, caractères colloïdaux, solubilité dans les solutions alcalines, précipitabilité par les acides. Par fractionnement selon la méthode de Burges [3], on obtient à partir de ces substances des acides fulviques, hymétomélaniques et humiques (voir tableau I). Leurs dimensions moléculaires, mesurées par filtration sur gel de Séphadex, sont comparables (voir tableau II) et ne diffèrent pas de celles qu'on trouve dans la littérature pour les composés humiques [24].

TABLEAU I. — **Fractionnement des substances humiques selon la méthode de Burges [3].**

	ACIDES FULVIQUES FRACTIONS		AC. HYMÉTO-MÉLANIQUES FRACTIONS		ACIDES HUMIQUES FRACTIONS	
	Couleur	%	Couleur	%	Couleur	%
Azotobacter	jaune	53*	rouge	7	noir	40
Mor	jaune	25*	rouge	15	noir	60
Mull	rouge	42*	orange	8	noir	50
Rendzine	rouge	57*	jaune	3	noir	44

* Calculé par différence au cent.

TABLEAU II. — **Filtration de la substance para-humique et des humus de trois sols à travers du gel de Séphadex.**

	TYPE DU SEPHADEX	POIDS MOLÉCULAIRE LIMITES D'EXCLUSION	POIDS MOLÉCULAIRE PROBABLE
Substance para-humique	G-100	5 000-100 000	40 000-60 000
Humus (Mor)	G-200	5 000-200 000	40 000-200 000
Humus (Mull)	G-200	5 000-200 000	40 000-100 000
Humus (Rendzine) ..	G-75	1 000-50 000	20 000-40 000

PRINCIPAUX CARACTÈRES CHIMIQUES.

Le tableau III montre les principaux caractères chimiques et les résultats des différents dosages sur les échantillons examinés. On ne peut pas tenir compte du pourcentage de la matière organique dans les parties dialysables des sols, car l'extraction a été effectuée au pyrophosphate, donc les sels sont dans ces fractions. Pour la même raison, nous n'y avons pas dosé P.

Le dosage de C organique dans la fraction dialysable de la culture d'*Azotobacter* n'a pas d'intérêt, car il reste dans le milieu nutritif un excès de benzoate non métabolisé par le microorganisme. Il est toutefois intéressant de remarquer la présence dans les fractions non dialysables d'un pourcentage assez élevé de matière inorganique ; il est possible qu'une partie de celle-ci provienne de complexes formés entre les substances humiques et les métaux.

Les chiffres concernant matière organique et C organique sont comparables. Il est à souligner, en revanche, que la quantité de N total est très faible dans la substance para-humique microbienne et celle de P très forte, tandis que, dans les extraits humiques, c'est l'inverse. Le pourcentage en acides aminés est plus élevé dans la substance para-humique, mais ce sont les extraits humiques de sols qui sont plus riches en glucides.

Tableau III. — **Principales caractéristiques chimiques et résultats des dosages.**

	Matière organique	Cendres	C organique	N total	P total	% acides aminés	% glucides	
a) Fractions dialysables								
Azotobacter	62,36	37,64	—	0,03	1,4	0,0035		0,06
Mor	—	—	5,16	0,15	—	0,024		0,31
Mull	—	—	6,22	0,10	—	0,010		0,33
Rendzine	—	—	6,57	0,19	—	0,015		0,34
b) Fractions non dialysables							% Ac. am après hydrolyse	Glucides
Azotobacter	63,69	36,31	40,00	0,34	5,75	0	1,2*	1,57*
Mor	75,73	24,27	34,60	1,90	0,86	0	0,86*	2,73*
Mull	78,00	22,00	36,90	2,54	1,30	0	0,20*	5,9*
Rendzine	65,30	34,70	29,60	2,13	1,33	0	0,20*	6,14*

Chiffres exprimés en % matière sèche
* Calculé par rapport à la matière organique

Les tableaux IVa et IVb montrent la composition en acides aminés des fractions dialysables et non dialysables des trois extraits humiques et de la substance para-humique. Nous pouvons constater la plus grande analogie entre la substance para-humique et l'humus du mor. On peut remarquer également que l'on ne retrouve pas les mêmes acides aminés dans les fractions dialysables et non dialysables. Cependant, il n'y a pas de grandes différences entre les divers échantillons.

Le tableau V montre les acides organiques identifiés dans les fractions dialysables et le tableau VI les glucides de ces deux types de fractions après hydrolyse acide.

TABLEAU IV. — **a) Acides aminés identifiés dans les fractions dialysables.**

	α Alanine	α Amino butyrique	Arginine	Asparagine	Ac. aspartique	Cystéine	Ac. glutamique	Glycocolle	Leucine	Lysine	Norvaline	Phénylalamine	Sérine	Tyrosine	Valine	Total
Azotobacter	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+	10
Mor	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	12
Mull	+	—	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	7
Rendzine	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	9

b) Acides aminés identifiés dans la fraction non dialysable après hydrolyse acide.

	α Alanine	Arginine	Ac. aspartique	β Alanine	Cystéine	Ac. glutamique	Glycocolle	Isoleucine	Leucine	Lysine	Phénylalanine	Proline	Sérine	Thréonine	Tryptophane	Tyrosine	Valine	Total
Azotobacter	+	—	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	10
Mor	+	—	—	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	10
Mull	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	15
Rendzine	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	15

TABLEAU V. — **Acides organiques identifiés dans les fractions dialysables.**

	Acide tartrique	Acide malonique	Acide succinique	Acide glutarique	Acide pyruvique	Acide lactique	Acide citrique
Azotobacter	+	+	+	+	+	—	—
Mor	+	—	—	+	—	+	+
Mull	+	—	—	+	—	—	+
Rendzine	+	—	—	+	—	—	—

TABLEAU VI.

	Arabinose	Ribose	Xylose	Rhamnose	Déoxyribose	Glucose	Galactose	Mannose	Sorbose
a) glucides identifiés dans les fractions dialysables									
Azotobacter	—	—	—	—	+	+	—	—	—
Mor	—	—	—	—	+	+	—	—	—
Mull	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Rendzine	—	—	—	—	+	—	—	—	—
b) glucides identifiés dans les fractions non dialysables après hydrolyse									
Azotobacter	—	—	—	—	?	+	—	—	—
Mor	—	—	—	+	traces	+	+	+	—
Mull	—	—	—	+	+	+	+	+	?
Rendzine	+	+	—	—	—	+	+	+	—

ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE.

a) RÉGION U. V. — L'analyse du spectre des fractions non dialysables, dans la région U. V., donne, pour toutes les substances, une absorption continue assez régulière, c'est-à-dire que l'absorption augmente au fur et à mesure que diminue la longueur d'onde. Des résultats analogues ont été décrits par d'autres chercheurs [**11**, **17**] à propos des substances humiques.

b) RÉGION I. R. — Dans la figure 1, nous avons représenté les spectres d'absorption dans l'infrarouge des fractions non dialysables. D'après l'interprétation des auteurs [**6**, **14**, **21**, **27**, **34**, **26**], la bande d'absorption à 3 200-3 400 cm^{-1}, présente dans toutes nos substances, correspond à des groupes —OH associés par des liaisons hydrogène ; la bande d'absorption à 1 625 cm^{-1} correspond aux noyaux aromatiques plus ou moins condensés, et elle est considérée comme caractéristique de la molécule de l'humus.

La bande d'absorption à 1 120-1 170 cm^{-1}, absente dans le mor, peut être due au groupe —OCH_3 aromatique.

La bande d'absorption à 1 020-1 070 cm^{-1}, présente dans le mull et la rendzine est due au Si-O des argiles ; la bande d'absorption à 840 cm^{-1}, présente dans la substance para-humique est due aux —CH aromatiques. La bande à 725 cm^{-1}, présente dans toutes les substances, est due aux structures aromatiques polycycliques.

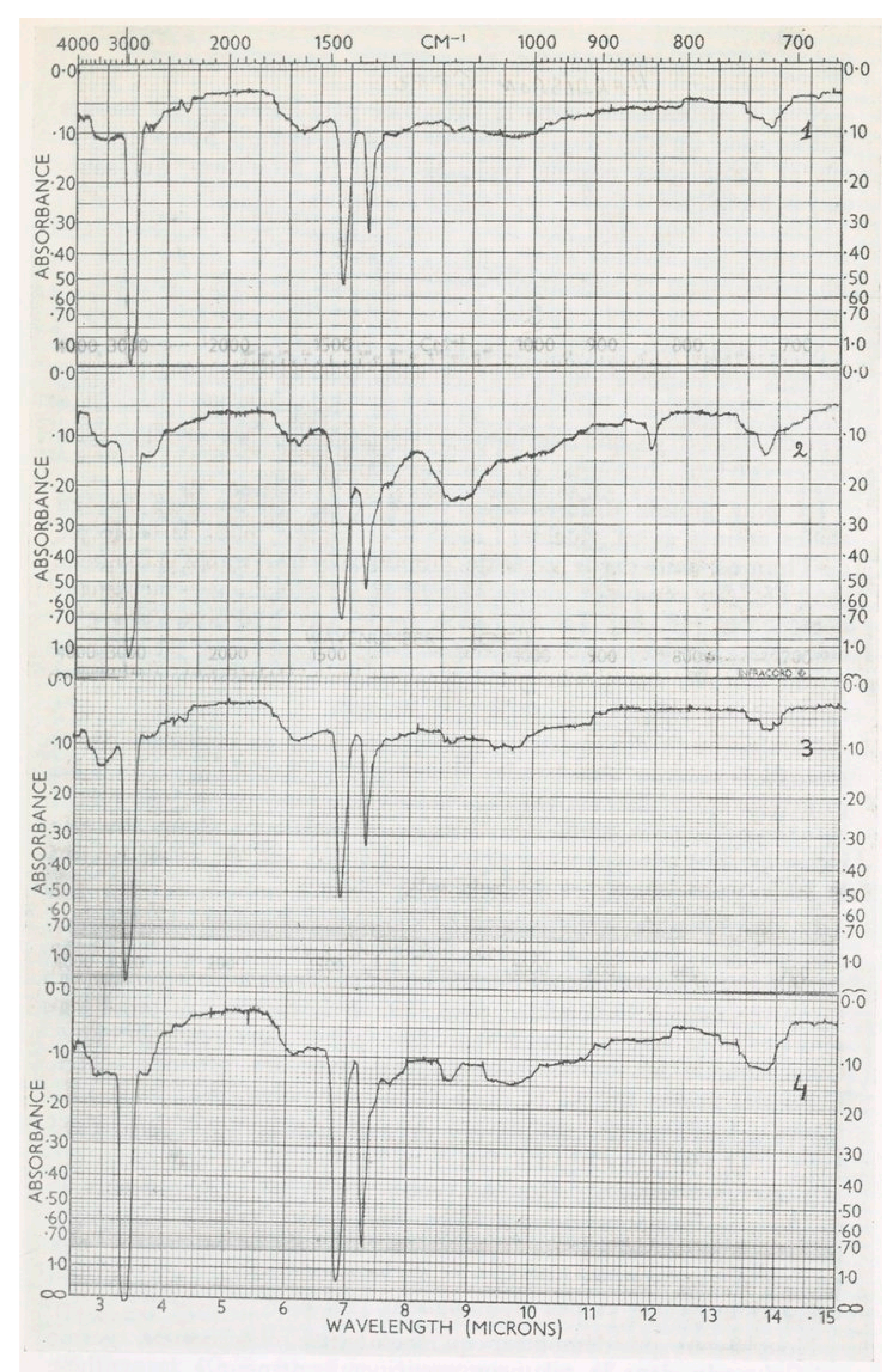


FIG. 1. — *Spectres d'absorption dans l'I.R. des fractions non dialysables.*
1 = humus (mor). 2 = substance para-humique. 3 = humus (mull).
4 = humus (rendzine).

Nous trouvons donc dans la substance para-humique des bandes d'absorption caractéristiques relevées dans les extraits humiques des sols et considérées comme typiques, dans la littérature, des substances humiques.

DISCUSSION

Nous avons trouvé dans la substance para-humique microbienne et dans les extraits humiques des trois sols les mêmes propriétés physico-chimiques : couleur, solubilité, précipitabilité, dimension moléculaire, et ce que l'on appelle classiquement en pédologie les acides fulvique, humique et hymétomélanique.

La plus grande différence se trouve dans les pourcentages en acides aminés et en glucides ; mais il est admis, pour la molécule de l'humus, une partie centrale aromatique très stable à laquelle sont liés des composés azotés (α-aminés) et glucidiques facilement détachables [**16, 30**]. La libération facile, par hydrolyse, des glucides et des acides aminés confirme cette hypothèse. C'est donc le noyau central, caractéristique des substances humiques, qui nous intéresse surtout comme critère d'analogie.

La similitude des spectres d'absorption dans la région U. V. et surtout l'existence des bandes d'absorption dans le spectre I. R., caractéristiques des structures aromatiques condensées (1 625 cm^{-1} et 725 cm^{-1}), nous permettent d'affirmer l'existence d'une analogie entre la substance para-humique synthétisée par *A. chroococcum* et les extraits humiques de trois sols.

La synthèse de cette substance para-humique par *Azotobacter chroococcum* pourrait se faire en deux phases ; une première phase enzymatique avec l'intervention de la phénoloxydase que Küster [**18**] a trouvée dans l'*Azotobacter,* pour donner le catéchol et postérieurement la quinone ; et une deuxième phase purement chimique, dans laquelle les quinones réagiraient avec les groupes $-NH_2$ libres des acides aminés et donneraient par polymérisation la substance para-humique, en accord avec l'hypothèse de Swaby et Ladd [**31**] pour la synthèse des substances humiques.

Il est très probable que des voies multiples existent dans le sol pour la formation des polymères humiques. Certains microorganismes sont capables de synthétiser des corps répondant aux critères des substances humiques ; ces microorganismes sont surtout des actinomycètes et des champignons [**15, 4**].

Nous avons pu démontrer qu'*Azotobacter choococcum,* germe très répandu dans le sol, peut participer également à la synthèse des polymères humiques.

RÉSUMÉ

L'étude chimique et physico-chimique comparée des extraits humiques de trois sols différents avec une substance synthétisée par une souche d'*Azotobacter chroococcum* cultivée sur benzoate de sodium a été effectuée. L'analyse qualitative et quantitative de ce qu'il est classique d'appeler acides fulvique, humique et hymétomélanique, des acides aminés, glucides, acides organiques, ainsi que les spectres U. V. et I. R. et d'autres analyses chimiques et physico-chimiques de ces substances permettent de constater l'analogie du polymère d'origine microbienne et des extraits humiques des sols.

L'éventuelle participation d'*Azotobacter* à la synthèse des substances humiques est discutée.

SUMMARY

SYNTHESIS OF PARA-HUMIC SUBSTANCES BY *Azotobacter chroococcum*.

We report on a comparative chemical and physiochemical study of the humic extracts of three natural soils and of a humic-like substance synthetized by a strain of *Azotobacter chroococcum* cultivated on sodium benzoate as the sole source of carbon.

The extracts were fractionated by dialysis and precipitation in three main fractions : fulvic, humic and hymetomelanic acids. U. V. and J. R. absorption spectra, approximative molecular weights (on Sephadex column), the presence of amino acids, carbohydrates and other chemical properties were determined. The results of the studies reveal a close analogy between the natural humic extracts and the *Azotobacter*-synthetized humic-like substance.

BIBLIOGRAPHIE

[1] BANCHER (E.) et SCHERZ (H.). *Mikrochim. Acta,* 1964, **6**, 1159.
[2] BRAM (D.) et GEENEN (H.). *J. Chromatog.,* 1962, **7**, 56.
[3] BURGES (A.). *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.,* 1960, Ser. A, **1**, 53.
[4] CAPRIOTTI (A.). *Nature,* 1961, **190**, 464.
[5] DUCHAUFOUR (Ph.). *Précis de Pédologie.* Masson, édit., Paris, 1960.
[6] FARMER (V. C.) and MORRISON (R. I.). *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.,* 1960, Ser. A, **1**, 85.
[7] FAURE (M.). *in* J. LOISELEUR, *Techniques de Laboratoire,* 2e édit., Masson, édit., Paris, 1954.
[8] FELBECK (G. T. Jr). *Adv. Agronomy,* 1965, **17**, 327.
[9] FLAIG (W.). *Geochim. Cosmochim. Acta,* 1964, **28**, 1523.

[10] HARDISSON (C.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1966, **111**, 66.
[11] HAYASHI (T.) and NAGAI (T.). *Soil Plant Food,* 1957, **2**, 171.
[12] HOUGH (L.), JONES (J. K. N.) and WADMAN (W. H.). *J. chem. Soc.,* 1950, 1072.
[13] ISHERWOOD (F. A.) and JERMYN (M. A.). *Biochem. J.,* 1951, **48**, 515.
[14] JUSTE (C.) et DUREAU (P.). *C. R. Acad. Sci.,* 1964, **259**, 612.
[15] KANG (K. S.) and FELBECK (G. T. Jr.). *Soil Sci.,* 1965, **99**, 175.
[16] KONONOVA (M. M.). *Soil organic matter,* Pergamon Press, 1961.
[17] KUMADA (K.). *Soil Plant Food,* 1958, **4**, 145.
[18] KÜSTER (E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.,* 1953, **160**, 207.
[19] LINSKENS (H. F.). *Papierchromatographie in der Botanik.* Springer-Verlag, 1955.
[20] MARTIN (F.), DUBACH (P.), MEHTA (N. C.) und DEEL (H.). *Pflanzenernähr.,* 1963, **103**, 27.
[21] ORLOV (D. S.), ROZANOVA (O. N.) and MATYUKHINA (S. G.). *Soviet Soil Sci.,* 1962, **1**, 15.
[22] PARTRIDGE (S. N.). *Nature,* 1949, **164**, 443.
[23] PIGNAUD (G.), MILKOWSKA (A.), CHALVIGNAC (M. A.), ROBERT-GERO (M.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1966, **111**, 76.
[24] PIRET (E. L.), WHITE (R. G.), WALTHER (H. C.) and MADDEN (A. I.). *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.,* 1960, Ser. A, **1**, 69.
[25] ROSEN (H.). *Arch. Biochem. Biophys.,* 1957, **67**, 10.
[26] SCHNITZER (M.) and GUPTA (U. C.). *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.,* 1964, **28**, 374.
[27] SCHNITZER (M.) and DESJARDINS (J. G.). *Canad. J. Soil Sci.,* 1965, **45**, 257.
[28] SHIELDS (R.) and BURNETT (W.). *Anal. Chem.,* 1960, **32**, 885.
[29] SHOREY (E. O.). *J. agr. Res.,* 1914, **3**, 357.
[30] STEELINK (C.). *J. Chem. Ed.,* 1963, **40**, 379.
[31] SWABY (R. J.) and LADD (J. N.). *Trans. intern. Soc. Soil Sci.,* 1962, Comm. IV et V.
[32] WHITEHEAD (D. C.). *Nature,* 1964, **202**, 417.
[33] WOLLENWEBER (P.). *J. Chromatog.,* 1962, **9**, 369.
[34] WRIGHT (J. R.) and SCHNITZER (M.). *Nature,* 1961, **190**, 703.
